

**Untersuchungen über den lokalen Einfluß
antirheumatischer Substanzen
auf das Hyaluronidasespreading**

Wolfgang Ullrich

1964

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. W. Seitz

**Untersuchungen über den lokalen Einfluß
antirheumatischer Substanzen
auf das Hyaluronidasespreading**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Ullrich

Teplitz-Schönau (Sudetenland)

München 1964

Untersuchungen über den lokalen Einfluss
antihistaminischer Substanzen
auf das Hyaluronidase-Spreitungs-

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Gesamten Medizin
verfaßt und
einer Höheren Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr.W.SEITZ
Dekan: Professor Dr.R. BACHMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 14.1.1964

München 1964

Inhaltsverzeichnis

Problematik	4
Eigene Versuche	6
Methodik	6
Versuchsreihen	8
Ergebnisse	17
Statistische Auswertung	19
Diskussion	34
Zusammenfassung	38
Literaturverzeichnis	39

Problematik

Es werden Zusammenhänge zwischen chronischer Polyarthrit^{is} und Hyaluronidaseaktivität vermutet¹⁻¹⁹. Außerdem wurde die hemmende Wirkung von Antirheumatika auf die Hyaluronidase festgestellt^{1,7,13,15,16,20-37}. Es ist demnach die Vermutung naheliegend, daß vielleicht die Hemmung der Hyaluronidase durch antirheumatische Substanzen in gewisser Beziehung zum therapeutischen Effekt steht, oder wenigstens einen Teileffekt der antirheumatischen Wirkung darstellt. M a t h i e s und Mitarbeiter haben deshalb Untersuchungen vorgenommen, die den Wirkungsmechanismus der Hyaluronidasehemmung im allgemeinen und speziell durch Antirheumatika näher aufklären sollten³⁸⁻⁶⁴.

Zunächst konnte die hyaluronidasehemmende Wirkung verschiedener antirheumatischer Substanzen nach parenteraler Applikation bei intakten Ratten unter Anwendung eines auf dem Spreading-Effekt beruhenden Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddeltests bestätigt bzw. nachgewiesen werden³⁸⁻⁵¹. Weitere gleichartige Versuche an adrenalectomierten Tieren zeigten ein Ausbleiben des Hemmungseffektes^{38,41,42,44,47,52-57}, womit die Folgerung berechtigt war, daß die Nebenniere im Ablauf der Hyaluronidasehemmung eine Rolle spielt. Zugleich erhob sich die Frage, ob die Rinde oder das Mark der Nebenniere in den Hemmungsmechanismus eingeschaltet ist.

Die Nebennierenrinde wird durch die gebräuchlichen Antirheumatika stimuliert, was an der deutlich sichtbaren Abnahme des Ascorbinsäuregehaltes der Nebenniere, dem Ausdruck der inkretorischen Aktivität der Rinde, nachweisbar ist^{35,42,56}. Dieser Depletionseffekt, der sich an intakten Ratten unter Einfluß von hyaluronidasehemmenden Substanzen zeigen läßt, bleibt bei hypophysektomierten Tieren aus, wie D o m e n j o z³⁵ am Beispiel der Azetylsalizylsäure, des

Natriumsalizylats und anderer Stoffe bewiesen hat.

M a t h i e s stellte hingegen in Versuchen mit hypophys-ektomierten Ratten fest, daß bei diesen Tieren die Hyaluronidasehemmung durch die gleichen Antirheumatika voll erhalten bleibt, obwohl die Ascorbinsäure-Depletion der Nebenniere fehlt ^{42,47,52-54,56,57}. Auf Grund dieser Ergebnisse konnte nun die Notwendigkeit der inkretorischen Funktion der Nebennieren-Rinde für die Hyaluronidasehemmung ausgeschlossen werden. Somit mußte dem Nebennieren-Mark die entscheidende Rolle im Hemmungsmechanismus der Hyaluronidase zugeschrieben werden.

Diese Annahme wurde einmal bestätigt durch den indirekten Nachweis einer Nebennierenmark-Katecholaminausschüttung, indem man nach Einwirkung verschiedener hyaluronidasehemmender Substanzen den Katecholamingehalt der Nebennieren bestimmte und eine signifikante Abnahme des Katecholamingehaltes feststellte ^{42,52,56-60}. Zum anderen führten Adrenalin und Noradrenalin sowohl bei intakten als auch bei adrenaletomierten Ratten zu einer Hyaluronidasehemmung etwa gleicher Größenordnung wie die der Antirheumatika ⁶¹⁻⁶³. Eine weitere Fundierung dieser Befunde bedeutete die Feststellung, daß die Hyaluronidasehemmung ausfällt, wenn die Katecholaminwirkung durch Adrenolytika (z.B. Ergotamin) blockiert wird ⁶². Das gleiche Ergebnis erzielte man, indem eine Blockierung schon am Nebennierenmark durch Ganglienblocker wie Pendiomid gesetzt wurde ⁶⁴. Somit konnte M a t h i e s den Mechanismus der Hyaluronidasehemmung dahingehend erklären, daß nach Applikation von hyaluronidasehemmenden Substanzen, darunter die gebräuchlichen Antirheumatika, eine Aktivierung des Nebennierenmarkes mit Katecholaminausschüttung erfolgt, die schließlich auf eine noch nicht endgültig geklärte Wirkungsweise die Hemmung der Hyaluronidase hervorruft.

In allen Tierversuchen, die unter Verwendung des oben genannten Quaddeltests unternommen worden waren, hatte man die zu prüfenden antirheumatischen Substanzen parenteral (i.v., s.c., intraperitoneal, durch Hautresorption etc.) so appliziert, daß einer möglichen Direkteinwirkung auf die

Hyaluronidase die Verteilung über den Organismus vorschaltet war.

Aufgabe der vorgelegten Arbeit war es zu untersuchen, welchen Einfluß die Antirheumatika Butazolidin und Natriumsalizylat hinsichtlich der Hyaluronidasehemmung in vivo ausüben, wenn diese Substanzen im Quaddeltest primär der Farbstoff- bzw. Farbstoff-Hyaluronidase-Lösung zugesetzt werden.

Eigene Versuche

Methodik

Bei den Untersuchungen kam der sogenannte Spreadingtest zur Anwendung:

Wird ein Farbstoff, z.B. Evans-blue, intracutan injiziert, so entsteht eine farbige Hautquaddel, die sich mit der Zeit flächig ausbreitet, da der Farbstoff in den umgebenden Zwischenzellraum diffundiert. Wenn man zugleich mit der Farbstofflösung Hyaluronidase (spreading-factor) in die Quaddel injiziert, stellt man fest, daß diese Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddel (FH) nach der gleichen Zeit eine größere Ausbreitung zeigt als die reine Farbstoff-Quaddel (F), was auf die Hyaluronidasewirkung zurückzuführen ist. Im Falle einer teilweisen Hyaluronidasehemmung erreicht die FH-Quaddel nicht ihren Ausgangswert. Eine Totalhemmung ist theoretisch eingetreten, wenn die FH-Quaddel nur so groß ausfällt wie die F-Quaddel. Mit zunehmender Hemmung nimmt also die Fläche der FH-Quaddel an Größe ab. Die Flächen-differenz zwischen einer gehemmten und einer ungehemmten FH-Quaddel nach gleicher Ausbreitungszeit kann deshalb als Indikator für die Hemmung des Hyaluronidase-Effektes benutzt werden.

Als Versuchstiere wurden 180-200 g schwere männliche weiße Ratten verwendet. In einer kurzen Äthernarkose erhielten sie s.c. Evipan-Natrium appliziert (30 mg/100 g Körpergewicht). Damit erzielte man die für die Versuchsdauer nötige Vollnarkose. Nachdem dann die Tiere in Rückenlage auf Brettchen gespannt worden waren, folgte die saubere

Enthaarung der Bauchhaut vom Thoraxunterrand bis zur Leistenengegend mit Pilca. Auf dieser Fläche wurden nun pro Tier 6 Quaddeln gesetzt: 3 auf jeder Bauchseite, wobei die Lokalisation der verschiedenen Quaddeln im Rahmen einer Versuchsreihe (6 Tiere) mit Hilfe des Lateinischen Quadrates variiert wurde, und damit jede Lokalisationsmöglichkeit bei jedem der 6 Versuchstiere einmal zur Anwendung kam (siehe Tabelle 1,3,5,7,9,11). Zunächst erhielten die Tiere ein Leer-Quaddelpaar gespritzt, d.h. eine F- und eine FH-Quaddel ohne Zusätze. Dann folgten die beiden anderen Paare, je eine F- und FH-Quaddel, in die jeweils eine bestimmte Konzentration der zu untersuchenden antirheumatischen Substanzen, Butazolidin und Natriumsalizylat, mitinjiziert wurde. Der verwendete Farbstoff aller Quaddeln war 0,6%ige Evansblue-Lösung, im Falle der Leer-Quaddeln nochmals mit physiologischer NaCl-Lösung 99:1 verdünnt, um eine durchgehend konstante Farbstoffkonzentration zu erhalten, da bei den übrigen Quaddeln in diesem Verhältnis die Antirheumatika zugesetzt wurden. Zur Herstellung der FH-Quaddeln löste man in 2 ml der oben beschriebenen Evansblue-Lösung 150 I.E. Hyaluronidase, von der jeweils 7,5 I.E. zur Wirkung kamen, weil die pro Quaddel mit Hilfe einer Tuberkulinspritze und 18er Kanüle streng intracutan injizierte Flüssigkeit in jedem Fall 0,1 ml betrug. Bei allen Quaddeln erfolgte 10 Minuten nach Setzen die Festlegung der Farbstoffausbreitung durch Nachziehen der Farbkontur mittels Kopierstift. Die so erhaltene Fläche übertrug man dann auf einen Zelluloidstreifen, auf dem der Flächeninhalt planimetrisch bestimmt werden konnte. Bei einer Versuchsreihe wurden die Untersuchungen an adrenaletomierten Tieren vorgenommen. Die Adrenaletomie wurde in Äthernarkose ausgeführt. Man ging dabei neben der Rückenmuskulatur beiderseits in Nierennöhe in die Bauchhöhle ein, suchte die oberen Nierenpole auf und entfernte dort mit der Pinzette stumpf die Nebennieren. Darauf wurden die Öffnungen durch zwei einfache Nähte wieder verschlossen. Die Tiere erhielten nachher reichlich kohlenhydratreiche Nahrung, bestehend aus Haferflocken und Rohr-

zucker, ebenso physiologische NaCl-Lösung, um den gestörten Ionenhaushalt auszugleichen. Nach 48 Stunden wurden sie schließlich dem Spreadingtest unterzogen, da in dieser Zeit eine Regeneration chromaffinen Gewebes ausgeschlossen sein soll.

Versuchsreihen

Versuchsreihe 1

Intakten Ratten wurde zunächst je ein Leerquaddelpaar (F_1 u. FH_1) der oben beschriebenen Zusammensetzung injiziert. Das folgende 2. Quaddelpaar (F_2 u. FH_2) enthielt pro Farbstoff- als auch Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel als Zusatz 0,2 mg Butazolidin. Für das 3. Quaddelpaar wurden 0,02 mg Butazolidin zugegeben. Die Farbstoffausbreitung wurde bei allen Quaddeln 10 Minuten nach der Injektion durch die oben beschriebene Methode gesichert.

Versuchsreihe 2

Versuchstiere waren intakte Ratten, denen ein Leerquaddelpaar, ein Quaddelpaar mit dem Zusatz von 0,002 mg Butazolidin und ein Quaddelpaar mit jeweils 0,0002 mg Butazolidinzusatz gesetzt wurde. Die Methodik war die gleiche wie in Versuchsreihe 1.

Versuchsreihe 3

Die Untersuchungen erfolgten an intakten Tieren in der gleichen Versuchsanordnung wie Reihe 1 und 2, nur wurden beim 2. Quaddelpaar 0,008 mg Butazolidin und beim 3. Paar 0,014 mg Butazolidin mitappliziert.

Versuchsreihe 4

Die Methodik ist die selbe wie in den vorangegangenen Versuchsreihen, auch hier bei intakten Tieren. Dem 2. Quaddelpaar waren 0,5 mg Natriumsalizylat, dem 3. Quaddelpaar 0,05 mg Natriumsalizylat zugesetzt.

Versuchsreihe 5

Die Zusatzmenge zum 2. Quaddelpaar betrug 0,005 mg Natriumsalizylat, zum 3. Paar 0,0005 mg Natriumsalizylat. Die Methodik wurde sonst nicht geändert.

Versuchsreihe 6

Auch in dieser Reihe ist die Methodik die gleiche wie in den vorhergehenden. An intakten Tieren wurde die hyaluronidasehemmende Wirkung des Natriumsalizylats untersucht, von dem 0,05 μ g in das 2. Quaddelpaar und 0,005 μ g in das 3. Quaddelpaar mitinjiziert wurden.

Versuchsreihe 7a und 7b

Hier wurden Ratten verwendet, die nach der oben beschriebenen Methode adrenaletomiert worden waren. Außerdem betrug die Zahl der Tiere in diesen Versuchsreihen nur 4 Tiere. Die Methodik der Quaddelapplikation blieb die gleiche. Zu untersuchende Substanzen waren 0,2 mg Butazolidin und 0,5 mg Natriumsalizylat pro Quaddel.

In Reihe 7a wurde zum 2. Quaddelpaar Butazolidin und zum 3. Quaddelpaar Natriumsalizylat zugesetzt.

In Reihe 7b erfolgte die Applikation in umgekehrter Reihenfolge.

Lokalisation	Tiernummer					
	I	II	III	IV	V	VI
1	F ₃	F ₂	FH ₁	F ₁	FH ₂	FH ₃
2	F ₁	FH ₂	FH ₃	F ₃	F ₂	FH ₁
3	F ₂	FH ₁	F ₁	FH ₂	FH ₃	F ₃
4	FH ₂	FH ₃	F ₃	F ₂	FH ₁	F ₁
5	FH ₃	F ₃	F ₂	FH ₁	F ₁	FH ₂
6	FH ₁	F ₁	FH ₂	FH ₃	F ₃	F ₂

T a b e l l e 1
(Lokalisationsschema, Versuchsreihe 1)

Versuchs- substanz	Quaddel- typ	Tiernummer					
		I	II	III	IV	V	VI
kein	F ₁	147	150	150	149	148	138
Zusatz	FH ₁	178	182	183	180	185	180
Butazol- idin	F ₂	138	133	140	141	145	140
0,2 mg	FH ₂	159	149	160	148	157	149
Butazol- idin	F ₃	152	149	154	159	154	153
0,02 mg	FH ₃	151	159	158	161	160	160

T a b e l l e 2
(Ergebnisse, Versuchsreihe 1)

Lokalisation	Tiernummer					
	I	II	III	IV	V	VI
1	F ₃	FH ₂	FH ₃	F ₂	FH ₁	F ₁
2	F ₁	F ₃	FH ₂	FH ₃	F ₂	FH ₁
3	FH ₃	F ₂	FH ₁	F ₁	F ₃	FH ₂
4	FH ₂	FH ₃	F ₂	FH ₁	F ₁	F ₃
5	F ₂	FH ₁	F ₁	F ₃	FH ₂	FH ₃
6	FH ₁	F ₁	F ₃	FH ₂	FH ₃	F ₂

T a b e l l e 3
(Lokalisationsschema, Versuchsreihe 2)

Versuchs- substanz	Quaddel- typ	Tiernummer					
		I	II	III	IV	V	VI
kein	F ₁	147	152	156	155	153	157
Zusatz	FH ₁	184	194	193	183	187	197
Butazol- idin	F ₂	164	145	160	146	166	155
0,002 mg	FH ₂	181	189	184	176	181	185
Butazol- idin	F ₃	154	165	159	150	155	158
0,0002 mg	FH ₃	183	205	198	180	185	202

T a b e l l e 4
(Ergebnisse, Versuchsreihe 2)

Lokalisation	Tiernummer					
	I	II	III	IV	V	VI
1	FH ₂	F ₃	F ₁	FH ₃	F ₂	FH ₁
2	F ₃	F ₁	FH ₃	F ₂	FH ₁	FH ₂
3	FH ₃	F ₂	FH ₁	FH ₂	F ₃	F ₁
4	FH ₁	FH ₂	F ₃	F ₁	FH ₃	F ₂
5	F ₁	FH ₃	F ₂	FH ₁	FH ₂	F ₃
6	F ₂	FH ₁	FH ₂	F ₃	F ₁	FH ₃

T a b e l l e 5
(Lokalisationsschema, Versuchsreihe 3)

Versuchs- substanz	Quaddel- typ	Tiernummer					
		I	II	III	IV	V	VI
kein	F ₁	149	150	140	142	155	153
Zusatz	FH ₁	181	185	170	170	180	185
Butazol- idin 0,008 mg	F ₂	152	148	145	166	144	140
	FH ₂	159	156	150	151	146	155
Butazol- idin 0,014 mg	F ₃	167	161	163	165	159	145
	FH ₃	152	155	150	150	156	153

T a b e l l e 6
(Ergebnisse, Versuchsreihe 3)

Lokalisation	Tiernummer					
	I	II	III	IV	V	VI
1	F ₁	FH ₂	FH ₁	F ₂	F ₃	FH ₃
2	FH ₂	FH ₁	F ₂	F ₃	FH ₃	F ₁
3	FH ₁	F ₂	F ₃	FH ₃	F ₁	FH ₂
4	F ₃	FH ₃	F ₁	FH ₂	FH ₁	F ₂
5	FH ₃	F ₁	FH ₂	FH ₁	F ₂	F ₃
6	F ₂	F ₃	FH ₃	F ₁	FH ₂	FH ₁

T a b e l l e 7
(Lokalisationsschema, Versuchsreihe 4)

Versuchs- substanz	Quaddel- typ	Tiernummer					
		I	II	III	IV	V	VI
kein	F ₁	157	156	163	159	174	152
Zusatz	FH ₁	195	208	220	197	220	204
Natrium- salizylat 0,5 mg	F ₂	160	150	162	175	166	158
	FH ₂	175	170	182	186	179	185
Natrium- salizylat 0,05 mg	F ₃	164	157	158	165	165	159
	FH ₃	179	184	180	184	175	187

T a b e l l e 8
(Ergebnisse, Versuchsreihe 4)

Lokalisation	Tiernummer					
	I	II	III	IV	V	VI
1	FH ₃	FH ₁	F ₂	F ₃	FH ₂	F ₁
2	F ₃	FH ₂	F ₁	FH ₃	FH ₁	F ₂
3	FH ₂	F ₁	FH ₃	FH ₁	F ₂	F ₃
4	F ₂	F ₃	FH ₂	F ₁	FH ₃	FH ₁
5	F ₁	FH ₃	FH ₁	F ₂	F ₃	FH ₂
6	FH ₁	F ₂	F ₃	FH ₂	F ₁	FH ₃

T a b e l l e 9
(Lokalisationsschema, Versuchsreihe 5)

Versuchs- substanz	Quaddel- typ	Tiernummer					
		I	II	III	IV	V	VI
kein	F ₁	142	141	165	138	152	155
Zusatz	FH ₁	180	170	195	165	200	180
Natrium- salizylat 0,005 mg	F ₂	143	140	155	132	146	140
	FH ₂	173	180	190	170	165	145
Natrium- salizylat 0,0005 mg	F ₃	146	150	153	150	143	159
	FH ₃	173	164	166	162	178	169

T a b e l l e 10
(Ergebnisse, Versuchsreihe 5)

Lokalisation	Tiernummer					
	I	II	III	IV	V	VI
1	FH ₁	FH ₂	F ₁	F ₂	FH ₃	F ₃
2	F ₁	F ₂	FH ₃	F ₃	FH ₁	FH ₂
3	FH ₃	F ₃	FH ₁	FH ₂	F ₁	F ₂
4	FH ₂	F ₁	F ₂	FH ₃	F ₃	FH ₁
5	F ₃	FH ₁	FH ₂	F ₁	F ₂	FH ₃
6	F ₂	FH ₃	F ₃	FH ₁	FH ₂	F ₁

T a b e l l e 11
(Lokalisationsschema, Versuchsreihe 6)

Versuchs- substanz	Quaddel- typ	Tiernummer					
		I	II	III	IV	V	VI
kein	F ₁	146	157	147	141	153	137
Zusatz	FH ₁	180	201	191	190	200	184
Natrium- salizylat 0,05 g	F ₂	137	160	144	151	165	150
	FH ₂	164	203	190	170	189	180
Natrium- salizylat 0,005 g	F ₃	153	156	142	158	163	157
	FH ₃	185	191	197	200	210	190

T a b e l l e 12
(Ergebnisse, Versuchsreihe 6)

Versuchs- substanz	Quaddel- typ	Tiernummer			
		I	II	III	IV
kein	F ₁	145	143	140	145
Zusatz	FH ₁	196	186	191	200
Butazol- idin	F ₂	154	160	140	151
0,2 mg	FH ₂	189	198	193	195
Natrium- salizylat	F ₃	163	165	150	155
0,5 mg	FH ₃	206	191	190	190

T a b e l l e 13
(Ergebnisse, Versuchsreihe 7a)

Versuchs- substanz	Quaddel- typ	Tiernummer			
		I	II	III	IV
kein	F ₁	147	142	139	140
Zusatz	FH ₁	194	190	188	191
Natrium- salizylat	F ₂	158	166	151	155
0,5 mg	FH ₂	195	186	186	188
Butazol- idin	F ₃	167	160	154	160
0,2 mg	FH ₃	194	191	190	189

T a b e l l e 14
(Ergebnisse, Versuchsreihe 7b)

Ergebnisse

Versuchsreihe 1

Die Einzelergebnisse sind aus Tabelle 2 ersichtlich.

Als Flächenmittelwerte der Leerquaddeln, also ohne Anti-rheumatikazusatz, ergaben sich für F_1 147 mm^2 und für FH_1 181 mm^2 . Beim 2. Quaddelpaar mit dem Zusatz von je $0,2 \text{ mg}$ Butazolidin sind es für F_2 140 mm^2 und für FH_2 154 mm^2 .

Im Vergleich mit F_1 ist also F_2 um 7 mm^2 , FH_2 verglichen mit FH_1 um 27 mm^2 kleiner ausgefallen. Das 3. Quaddelpaar mit Zusatz von jeweils $0,02 \text{ mg}$ Butazolidin zeigt mit 154 mm^2 für F_3 gegenüber F_1 eine geringe Vergrößerung von 7 mm^2 , mit 158 mm^2 für FH_3 gegenüber FH_1 eine Flächenabnahme von 23 mm^2 .

Versuchsreihe 2

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 4 hervor.

Als Leerquaddel zeigt F_1 eine durchschnittliche Farbstoffausbreitung von 153 mm^2 , FH_1 eine von 190 mm^2 . Mit dem Zusatz von je $0,002 \text{ mg}$ Butazolidin zum 2. Quaddelpaar ergibt sich für F_2 verglichen mit F_1 eine geringe Flächenzunahme von 3 mm^2 auf 156 mm^2 , für FH_2 verglichen mit FH_1 eine Flächenabnahme von 7 mm^2 auf 183 mm^2 . Beim 3. Quaddelpaar, dem je $0,0002 \text{ mg}$ Butazolidin zugesetzt worden war, ist F_3 mit 157 mm^2 um 4 mm^2 größer als F_1 , FH_3 mit 192 mm^2 um 2 mm^2 größer als FH_1 .

Versuchsreihe 3

Aus Tabelle 6 sind die Einzelergebnisse zu ersehen.

Die Leerquaddel F_1 ist durchschnittlich 148 mm^2 , FH_1 179 mm^2 groß. Im 2. Quaddelpaar mit Zusatz von $0,008 \text{ mg}$ Butazolidin hat sich F_2 auf 153 mm^2 , also um 5 mm^2 gegenüber F_1 vergrößert, FH_2 mit 153 mm^2 um 26 mm^2 gegenüber FH_1 verkleinert. Den gleichen Durchschnittswert 153 mm^2 hat im 3. Quaddelpaar mit dem Zusatz von $0,014 \text{ mg}$ Butazolidin auch FH_3 , während F_3 160 mm^2 groß ist, also 12 mm^2 größer als F_1 .

Versuchsreihe 4

Aus Tabelle 8 sind die Einzelergebnisse ersichtlich.

Die durchschnittlichen Leerquaddelwerte sind hier für F_1

160 mm² und für FH₁ 207 mm². Nach Zusatz von je 0,5 mg Natriumsalizylat zum 2. Quaddelpaar wurde die Fläche für F₂ um 2 mm² größer als F₁, also 162 mm², die Fläche für FH₂ um 27 mm² kleiner als FH₁, also 180 mm² gefunden. Das 3. Quaddelpaar enthielt als Zusatz je 0,05 mg Natriumsalizylat, worauf F₃ mit 161 mm² den Wert von F₁ um 1 mm² überschritt, während FH₃ mit 182 mm² um 25 mm² unter dem von FH₁ zurückblieb.

Versuchsreihe 5

Die Einzelwerte sind aus Tabelle 10 zu entnehmen.

Als Mittelwerte der Leerquaddeln F₁ und FH₁ wurden 149 mm² bzw. 182 mm² errechnet. Das 2. Quaddelpaar zeigt unter Zusatz von je 0,005 mg Natriumsalizylat bei F₂ mit 141 mm² eine um 8 mm² geringere Farbstoffausbreitung als F₁ und bei FH₂ mit 171 mm² eine um 11 mm² geringere Fläche als FH₁. Vergleicht man die Mittelwerte des 3. Quaddelpaares (Zusatz von jeweils 0,0005 mg Natriumsalizylat) mit denen der Leerquaddeln, so findet man F₃ mit 150 mm² um 1 mm² größer als F₁ und FH₃ mit 169 mm² um 13 mm² kleiner als FH₁.

Versuchsreihe 6

Einzelergebnisse siehe Tabelle 12.

Die mittlere Leerquaddelausbreitung hat für F₁ den Wert 147 mm², für FH₁ 191 mm². Jede Quaddel des 2. Quaddelpaares enthielt 0,05 mg Natriumsalizylat. Im Ergebnis vergrößerte sich F₂ im Durchschnitt um 3 mm² gegenüber F₁, d.h. erreichte 151 mm² Farbstoffausbreitung. FH₂ dagegen verkleinerte sich gegenüber FH₁ um 7 mm² mit dem Wert von 183 mm². Beim 3. Quaddelpaar ergaben sich unter Einwirkung von 0,005 mg Natriumsalizylat pro Quaddel für F₃ 155 mm² und für FH₃ 196 mm². Demnach ist F₃ verglichen mit F₁ um 8 mm², FH₃ im Vergleich mit FH₁ um 5 mm² flächenmäßig vergrößert.

Versuchsreihe 7a

Tabelle 13 zeigt die Einzelwerte.

Der Mittelwert beträgt 143 mm² für F₁, 193 mm² für FH₁ als Leerquaddeln. Quaddelpaar F₂ und FH₂ erhielten den Zusatz von 0,2 mg Butazolidin. F₂ verbreiterte sich mit

durchschnittlich 151 mm^2 gegenüber F_1 um 8 mm^2 , während FH_2 mit 194 mm^2 um 1 mm^2 größer als FH_1 ausfiel. Die Zugabe von $0,5 \text{ mg}$ Natriumsalizylat zum 3. Quaddelpaar bewirkte bei F_3 gegenüber F_1 eine durchschnittliche Wertzunahme von 15 mm^2 , also auf 158 mm^2 , bei FH_3 das gleiche Ergebnis wie FH_2 .

Versuchsreihe 7b

Einzelwerte siehe Tabelle 14.

Das Leerquaddelpaar lieferte Durchschnittswerte von 142 mm^2 für F_1 und 191 mm^2 für FH_1 . Beim 2. Quaddelpaar ergaben sich nach je $0,5 \text{ mg}$ Natriumsalizylatzusatz folgende Endwerte: für F_2 158 mm^2 , also 16 mm^2 größer als F_1 , für FH_2 189 mm^2 , demnach 2 mm^2 kleiner als FH_1 . Die Wirkung von $0,2 \text{ mg}$ Butazolidin pro Quaddel des 3. Paares zeigte sich in den Mittelwerten von 160 mm^2 bei F_3 und 191 mm^2 bei FH_3 . Somit verbreiterte sich F_3 verglichen mit F_1 um 18 mm^2 , wogegen FH_3 im Vergleich zu FH_1 keine Differenz aufweist.

Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

1. Statistische Methodik

Der statistischen Auswertung der Versuche haben wir ein lineares statistisches Modell zugrunde gelegt. Hierbei wird angenommen, daß der Messwert x_{ik} am i -ten Versuchstier unter dem k -ten Verfahren in 1. Näherung wie folgt dargestellt werden kann:

$$x_{ik}^{(j)} = T_i + V_k + L_j + \epsilon_{ik}^{(j)}$$

Es bedeutet hierin T_i eine Konstante, die nur vom i -ten Versuchstier, V_k eine Konstante, die nur vom k -ten Verfahren und L_j eine Konstante, die nur von der j -ten Lokalisation abhängt. μ ist eine Konstante, die nur aus Gründen der statistischen Methodik eingeführt wird und die unmittelbar für die Interpretation der Versuchsergebnisse keine Bedeutung besitzt.

Durch $\epsilon_{ik}^{(j)}$ wird der "Versuchsfehler" als Abweichung zwischen dem tatsächlich beobachteten Wert und seinem Er-

wartungswert im statistischen Modell gekennzeichnet. Von dem Versuchsfehler wird angenommen, daß er eine Zufallsvariable darstellt, deren Verteilung unabhängig ist von den Versuchstieren, den Verfahren und den Lokalisationen; es wird weiter vorausgesetzt, daß die Verteilung von $\epsilon_{ik}^{(j)}$ eine Normalverteilung mit dem Erwartungswert 0 und der Varianz σ^2 ist. Der Versuchsfehler ist dann statistisch durch die Varianz σ^2 gekennzeichnet.

Die Schätzung des Versuchsfehlers, d.h. die Schätzung von σ^2 erfolgte mit Hilfe mehrfacher Varianz-Analysen; die Rest-Varianz dieser Varianz-Analysen stellt die Schätzung von σ^2 dar.

In den Varianz-Analysen wurden außerdem mehrere statistische Hypothesen geprüft, die für die Beurteilung der Versuchsergebnisse von Bedeutung sind.

Hypothese H_1 : Es bestehen keine Unterschiede zwischen den individuellen Reaktionsniveaux der verschiedenen Versuchstiere, d.h. es ist

$$T_1 = T_2 = \dots = T_6.$$

Diese Hypothese wird mit Hilfe der Varianz-Komponente "Zwischen Tieren" geprüft.

Hypothese H_2 : Es bestehen keine Unterschiede zwischen den Wirkungen der einzelnen Verfahren, d.h. es ist

$$V_1 = V_2 = \dots = V_6.$$

Diese Hypothese wird mit Hilfe der Varianz-Komponente "Zwischen Verfahren" geprüft.

Hypothese H_3 : Die Lokalisationen innerhalb des Versuchsfeldes haben keinen Einfluß auf den Ausgang des Versuches, d.h. es ist

$$L_1 = L_2 = \dots = L_6.$$

Die Prüfung der Hypothesen erfolgte durch Vergleich der angegebenen Varianz-Komponenten mit der Rest-Varianz, d.h. dem Versuchsfehler, mit Hilfe des Varianz-Quotienten-Tests (F-Test). Die Hypothesen wurden verworfen, wenn die Prüf-

größe $F_{\text{emp.}}$ des Varianz-quotienten-Tests in der zugehörigen F-Prüfverteilung eine Überschreitungswahrscheinlichkeit besaß, die maximal den Wert 5% hatte. Die Überschreitungswahrscheinlichkeit von $F_{\text{emp.}}$ ist zugleich die Irrtumswahrscheinlichkeit für das Verwerfen der jeweiligen Hypothese; wir interpretierten sie im einzelnen wie folgt:

5,0% : schwache statistische Sicherung; kann nur als Hinweis auf einen realen Effekt angesehen werden;

1,0% : ausreichende statistische Sicherung;

0,1% : hohe statistische Sicherung.

Für die statistische Interpretation der Versuchsergebnisse ist die Aussage über die Hypothese 2 am wesentlichsten. Führt die Varianz-Analyse zum Verwerfen dieser Hypothese, so muß durch Prüfung zusätzlicher Hypothesen untersucht werden, in welcher Weise sich die 6 Verfahren einer Versuchsreihe unterscheiden. Zur Formulierung dieser Hypothesen ist es notwendig anzunehmen, daß die Parameter V_i der einzelnen Verfahren sich additiv aus anderen Parametern zusammensetzen.

Für die Parameter V_1 bis V_6 der Hypothese H_2 führen wir zunächst die folgenden neuen Bezeichnungen ein:

$V_K^{(E)}$: Effekt der Kontroll-Quaddel oder reinen Farbstoff-Quaddel;

$V_1^{(E)}$: Effekt der 1. Dosierung bei der reinen Farbstoff-Quaddel;

$V_2^{(E)}$: Effekt der 2. Dosierung bei der reinen Farbstoff-Quaddel.

Für die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel sollen

$$V_K^{(H)}, V_1^{(H)} \text{ und } V_2^{(H)}$$

die analoge Bedeutung haben. Es wird nun angenommen, daß jeder dieser Parameter sich wie folgt additiv zusammensetzt:

$$V_K^{(E)} = W^{(E)} + W_K^{(E)} \quad ; \quad V_K^{(H)} = W^{(H)} + W_K^{(H)}$$

$$V_1^{(E)} = W^{(E)} + W_S^{(E)} + W_1^{(E)} ; V_1^{(H)} = W^{(H)} + W_S^{(H)} + W_1^{(H)} ;$$

$$V_2^{(E)} = W^{(E)} + W_S^{(E)} + W_2^{(E)} ; V_2^{(H)} = W^{(H)} + W_S^{(H)} + W_2^{(H)} ;$$

Mit Hilfe dieser Parameter-Zerlegungen werden die nachstehenden Hypothesen geprüft.

Hypothese $H_{21}^{(E)}$: Im Mittel unterscheidet sich das Spreading der reinen Farbstoff-Quaddel nicht von demjenigen der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel, d.h. es ist

$$W^{(E)} = W^{(H)}.$$

Diese Hypothese wird mit Hilfe der Varianz-Komponente "Zwischen Quaddel-Typen" geprüft.

Hypothese $H_{22}^{(E)}$: Für die reine Farbstoff-Quaddel unterscheidet sich das Spreading zu den beiden Dosierungen im Mittel nicht von demjenigen der Kontroll-Quaddel, d.h. es ist

$$W_K^{(E)} = W_S^{(E)}.$$

Diese Hypothese wird mittels der Varianz-Komponente "Zwischen Kontroll- und Substanz-Quaddeln" geprüft.

Hypothese $H_{23}^{(E)}$: Für die reine Farbstoff-Quaddel unterscheidet sich das Spreading unter den beiden Dosierungen nicht, d.h. es ist

$$W_1^{(E)} = W_2^{(E)}.$$

Zur Prüfung dieser Hypothese dient die Varianz-Komponente "Zwischen Dosierungen".

Für die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel werden die analogen Hypothesen

$$H_{22}^{(H)} \text{ und } H_{23}^{(H)}$$

geprüft; hierzu werden die entsprechenden Varianz-Komponenten verwendet.

Die 5 Varianz-Komponenten, die zur Prüfung der oben formulierten 5 Teil-Hypothesen der Hypothese H_2 dienen, bilden zusammen eine vollständige orthogonale Zerlegung der Varianz-Komponente "Zwischen Verfahren", die ihrerseits zur Prüfung von H_2 dient.

Eine direkte Schätzung der im statistischen Modell eingeführten Parameter ist nicht möglich; geschätzt kann jeweils nur ihre Differenz werden. (Die Gründe hierfür sollen hier nicht erörtert werden.) Wir haben uns hier auf die Schätzung der Differenz zwischen den Parametern beschränkt, die zu zwei verschiedenen Verfahren gehören. Bedeutet hierzu $\bar{x}_i$ für das i-te Verfahren den Mittelwert der an den 6 Tieren beobachteten Messwerte unter diesem Verfahren, $\bar{x}_k$ den entsprechenden Mittelwert für das k-te Verfahren, so ist die Mittelwerts-Differenz $\mathcal{J}_{ik} = \bar{x}_i - \bar{x}_k$ ein Schätzwert für die Differenz zwischen den beiden Parametern V_i und V_k .

Im Hinblick darauf, daß bei der hier vorliegenden Fragestellung primär die Abweichung der Substanz-Quaddeln von den Kontroll-Quaddeln interessiert, haben wir lediglich die Mittelwerts-Differenzen zwischen den einzelnen Dosierungen und den zugehörigen Kontroll-Quaddeln für jeden Quaddel-Typ errechnet:

$$\mathcal{J}(D) = \bar{x}(D) - \bar{x}(K).$$

($\bar{x}(D)$: Mittelwert des betreffenden Quaddel-Typs für die Dosis D;

$\bar{x}(K)$: Mittelwert der Kontroll-Quaddel des betreffenden Quaddel-Typs.)

Als Schätzwert für die Differenz in dem Effekt zweier Dosierungen an dem gleichen Quaddel-Typ kann dann die Differenz

$$\mathcal{J}(D_1) - \mathcal{J}(D_2)$$

verwendet werden.

Als Schätzwert für die realen Differenzen zwischen den Parametern sind die Mittelwerts-Differenzen mit dem Schätzfehler behaftet, dessen Größe aus dem Versuchsfehler errechnet werden kann. Wir haben für die Mittelwerts-Dif-

ferenzen dementsprechend nach der Methode von T u k e y 95%-Konfidenzbereiche derart errechnet, daß mit 95% Wahrscheinlichkeit die Parameter aller 6 Verfahren in die angegebenen Konfidenzbereiche fallen. Enthält demnach ein Konfidenzbereich den Wert 0 nicht, so kann mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von maximal 5% behauptet werden, die zugehörige Mittelwertsdifferenz sei statistisch gesichert von Null verschieden.

2. Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Die Varianz-Analysen sind jeweils im oberen Teil der Tabellen 15 bis 21 wiedergegeben. Die Abkürzungen in den Schemata der Varianz-Analysen haben dabei folgende Bedeutung:

- n : Zahl der Freiheitsgrade der Varianz-Komponente;
- SAQ : Summen-Abstands-Quadrat;
- MAQ : Mittleres-Abstands-Quadrat;
- F_{emp.} : Varianz-Quotient zwischen der jeweiligen Varianz-Komponente und der Rest-Varianz (nur angegeben, wenn die Varianz-Komponente zahlenmäßig größer ist als die Rest-Varianz);
- p : Überschreitungswahrscheinlichkeit des Varianz-Quotienten F_{emp.} in der zugehörigen F-Prüfverteilung, zugleich Irrtumswahrscheinlichkeit beim Verwerfen der zugehörigen Hypothese (nur angegeben, wenn $p \leq 5,0\%$).

Am Fusse der Varianz-Analysen ist die Schätzung s der Versuchsstreuung angegeben; sie bildet die Grundlage zur Berechnung der 95%-Konfidenzbereiche.

Im zweiten Teil der Tabellen sind für jedes Verfahren die Mittelwerte aus den Beobachtungen an allen 6 Tieren angegeben (Spalte $\bar{x}(V)$). Die Spalte $d(V)$ enthält die beobachteten Mittelwerts-Differenzen gegenüber der jeweiligen Kontroll-Quaddel zusammen mit den Grenzen des 95%-Konfidenzbereiches.

In der Spalte "Sicherung" wurde angegeben, mit welcher Irrtumswahrscheinlichkeit die Aussage behaftet ist, die betreffende Mittelwerts-Differenz sei real von Null verschieden. Diese Angabe erfolgte jedoch nur, wenn die betreffende Irr-

tumswahrscheinlichkeit maximal 5% betrug.

Die Spalte "Hemmung" schließlich enthält die Angabe über die prozentuale Hemmung der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel, die in üblicher Weise errechnet wurde.

3. Diskussion der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Vorbemerkung: Da innerhalb einer Versuchsreihe zu 6 Tieren jeweils nur 2 Dosierungen miteinander verglichen werden konnten, ist bei der vorliegenden Versuchsanordnung der Vergleich zwischen Dosierungen zugleich ein Vergleich zwischen Tier-Gruppen. Hieraus wird erklärlich, daß sich eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Relation praktisch nur innerhalb der gleichen Versuchsreihe, d.h. der gleichen Tier-Gruppe zeigt, dagegen beim Vergleich verschiedener Versuchsreihen mitunter die niedrigere Dosierung einen stärkeren Effekt zeigt als die höhere, wenn der Vergleich zwischen Tiergruppen erfolgt.

Versuchsreihe 1-3

Die reine Farbstoff-Quaddel zeigt hier bis zur Dosierung 0,02 mg eine Erhöhung des Spreadings, die in der Dosierung 0,014 mg statistisch schwach gesichert ist. In der Dosierung 0,2 mg zeigt dieser Quaddel-Typ dagegen eine Hemmung des Spreadings. Der Unterschied zwischen den Dosierungen 0,02 mg und 0,2 mg ist statistisch hoch gesichert.

Die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel zeigt in der Dosierung 0,0002 mg eine Erhöhung, in allen anderen Dosierungen dagegen eine Hemmung des Spreadings. Der Unterschied im Verhalten zwischen den Dosierungen 0,0002 mg und 0,002 mg ist statistisch schwach gesichert. Eine statistisch gesicherte Hemmung des Spreadings dieses Quaddel-Typs läßt sich erst in der Dosierung 0,008 mg und dann in allen höheren Dosierungen nachweisen. Zwischen den Dosierungen 0,008 mg und 0,014 mg läßt sich statistisch keine Dosis-Wirkungs-Relation nachweisen, dagegen liegt eine solche zwischen den Dosierungen 0,02 mg und 0,2 mg vor. Ein Vergleich zwischen den Dosierungen 0,008 mg und 0,014 mg einerseits und den Dosierungen 0,02 und 0,2 mg andererseits ist nicht möglich, da sie an verschiedenen Tiergruppen untersucht wurden.

Versuchsreihe 4-6

Die reine Farbstoff-Quaddel zeigt hier kein systematisches Verhalten; insgesamt liegt jedoch für keine Dosierung eine statistisch faßbare Veränderung ihres Spreadings vor.

Die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel zeigt in der Dosierung 0,005 γ eine Erhöhung, in der Dosierung 0,05 γ und allen höheren Dosierungen eine Hemmung ihres Spreadings. Der Unterschied zwischen den Dosierungen 0,005 γ und 0,05 γ ist statistisch hoch gesichert. Die Hemmung im Spreading dieses Quaddel-Typs ist erst für die Dosierungen 0,0005 mg und 0,005 mg schwach gesichert, für die Dosierungen 0,05 mg und 0,5 mg dagegen hoch gesichert. Eine Dosis-Wirkungs-Relation ist statistisch nur zwischen den Dosierungen 0,0005 γ und 0,005 γ nachweisbar.

Versuchsreihe 7a und 7b

Weder für die reine Farbstoff-Quaddel noch für die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel lassen sich statistisch gesicherte Veränderungen im Spreading nachweisen. Im Spreading der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel zeigt sich kein Unterschied zwischen der Wirkung von 0,2 mg Butazolidin und derjenigen von 0,5 mg Natriumsalizylat. Gegenüber der Wirkung bei Normaltieren ist die Wirkung der beiden Substanzen bei adrenaletomierten Tieren, gemessen an den Mittelwerts-Differenzen geringer; sie beträgt hier etwa 37% derjenigen bei Normaltieren. Ebenso wie bei den Normaltieren zeigt sich zwischen den beiden Substanzen in den angewandten Dosierungen jedoch kein Wirkungsunterschied.

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	130	26	1,73	-
Zwischen Verfahren	5	6.060	1.212	80,80	0,1%
Zwischen Lokalisationen	5	66	13	-	-
Zw. Quaddel-Typen	1	2.827	2.827	100,00<	0,1%
Zw. Kontr.u.Subst. (F)	1	1	1	-	-
Zw. Dosierungen (F)	1	588	588	39,20	0,1%
Zw. Kontr.u.Subst. (H)	1	2.584	2.584	100,00<	0,1%
Zw. Dosierungen (H)	1	61	61	4,07	1,0%
Rest-Varianz	20	293	15		
Gesamt-Varianz	35	6.549	187		

Versuchsstreuung s = 3,83

Verfahren	$\bar{x}(V)$ mm ²	$s(V)$ mm ²	Sicherung	Hemmung
F _K	147			
H _K	181			
F _{0,02}	154	+ 7 ± 5,6	1,0%	
H _{0,02}	158	- 23 ± 5,6	0,1%	66,8%
F _{0,2}	140	- 7 ± 5,6	1,0%	
H _{0,2}	154	- 27 ± 5,6	0,1%	79,8%

T a b e l l e 15
(statistische Auswertung, Versuchsreihe 1)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	545	109	3,03	5,0%
Zwischen Verfahren	5	10.001	2.000	55,56	0,1%
Zwischen Lokalisationen	5	171	34	-	-
Zw. Quaddel-Typen	1	9.669	9.669	100,00	0,1%
Zw. Kontr.u.Subst. (F)	1	38	38	1,06	-
Zw. Dosierungen (F)	1	2	2	-	-
Zw. Kontr.u.Subst. (H)	1	20	20	-	-
Zw. Dosierungen (H)	1	271	271	7,53	5,0%
Rest-Varianz	20	725	36		
Gesamt-Varianz	35	11.442	327		

Versuchsstreuung s = 6,02

Verfahren	$\bar{x}(V)$ mm ²	$\delta(V)$ mm ²	Sicherung	Hemmung
F _K	153			
H _K	190			
F _{0,0002}	157	+ 7 ± 8,8	-	
H _{0,0002}	192	+ 2 ± 8,8	-	- 7,3%
F _{0,002}	156	+ 3 ± 8,8	-	
H _{0,002}	183	- 7 ± 8,8	-	20,4%

T a b e l l e 16
(statistische Auswertung, Versuchsreihe 2)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	199	40	1,08	-
Zwischen Verfahren	5	3.880	776	20,97	0,1%
Zwischen Lokalisationen	5	355	71	1,92	-
Zw. Quaddel-Typen	1	711	711	19,22	0,1%
Zw. Kontr.u.Subst. (F)	1	165	165	4,46	5,0%
Zw. Dosierungen (F)	1	352	352	9,51	1,0%
Zw. Kontr.u.Subst. (H)	1	2.652	2.652	71,68	0,1%
Zw. Dosierungen (H)	1	0	0	-	-
Rest-Varianz	20	736	37		
Gesamt-Varianz	35	5.170	148		

Versuchsstreuung s = 6,07

Verfahren	$\bar{x}(V)$ mm ²	$\sigma(V)$ mm ²	Sicherung	Hemmung
F _K	148			
H _K	179			
F _{0,008}	149	+ 1 ± 8,9	-	
H _{0,008}	153	- 26 ± 8,9	0,1%	98,7%
F _{0,014}	160	+ 12 ± 8,9	1,0%	
H _{0,014}	153	- 26 ± 8,9	0,1%	99,4%

T a b e l l e 17
(statistische Auswertung, Versuchsreihe 3)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	393	79	1,72	-
Zwischen Verfahren	5	10.126	2.025	44,02	0,1%
Zwischen Lokalisationen	5	269	54	1,17	-
Zw. Quaddel-Typen	1	7.225	7.225	100,00	0,1%
Zw. Kontr.u.Subst. (F)	1	8	8	-	-
Zw. Dosierungen (F)	1	1	1	-	-
Zw. Kontr.u.Subst. (H)	1	2.880	2.880	62,61	0,1%
Zw. Dosierungen (H)	1	12	12	-	-
Rest-Varianz	20	925	46		
Gesamt-Varianz	35	11.713	335		

Versuchsstreuung $s = 6,80$

Verfahren	$\bar{x}(V)$ mm ²	$\delta(V)$ mm ²	Sicherung	Hemmung
F _K	160			
H _K	207			
F _{0,05}	161	+ 1 ± 9,9	-	
H _{0,05}	182	- 25 ± 9,9	0,1%	56,0%
F _{0,5}	162	+ 2 ± 9,9	-	
H _{0,5}	180	- 27 ± 9,9	0,1%	60,3%

T a b e l l e 18
(statistische Auswertung, Versuchsreihe 4)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	1.144	229	2,89	5,0%
Zwischen Verfahren	5	7.054	1.411	17,86	0,1%
Zwischen Lokalisationen	5	519	104	1,32	-
Zw. Quaddel-Typen	1	6.267	6.267	79,33	0,1%
Zw. Kontr.u.Subst. (F)	1	23	23	-	-
Zw. Dosierungen (F)	1	169	169	2,14	-
Zw. Kontr.u.Subst. (H)	1	584	584	7,39	5,0%
Zw. Dosierungen (H)	1	10	10	-	-
Rest-Varianz	20	1.588	79		
Gesamt-Varianz	35	10.305	294		

Versuchsstreuung s = 8,91

Verfahren	$\bar{x}(V)$ mm ²	$\delta(V)$ mm ²	Sicherung	Hemmung
F _K	149			
H _K	182			
F _{0,0005}	150	+ 1 ± 13,02	-	
H _{0,0005}	169	- 13 ± 13,02	-	37,7%
F _{0,005}	143	- 6 ± 13,02	-	
H _{0,005}	171	- 11 ± 13,02	-	32,4%

T a b e l l e 19
(statistische Auswertung, Versuchsreihe 5)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	1.595	319	8,86	0,1%
Zwischen Verfahren	5	14.235	2.847	79,08	0,1%
Zwischen Lokalisationen	5	508	102	2,83	5,0%
Zw. Quaddel-Typen	1	13.533	13.533	100,00	0,1%
Zw. Kontr.u.Subst. (F)	1	152	152	4,22	-
Zw. Dosierungen (F)	1	40	40	1,11	-
Zw. Kontr.u.Subst. (H)	1	15	15	-	-
Zw. Dosierungen (H)	1	494	494	13,72	0,1%
Rest-Varianz	20	712	36		
Gesamt-Varianz	35	17.050	487		

Versuchsstreuung $s = 5,97$

Verfahren	$\bar{x}(V)$ mm ²	$s(V)$ mm ²	Sicherung	Hemmung
F _K	147			
H _K	191			
F _{0,005}	155	+ 8 ± 8,7	-	
H _{0,005}	196	+ 4 ± 8,7	-	- 11,3%
F _{0,05}	151	+ 4 ± 8,7	-	
H _{0,05}	183	- 8 ± 8,7	-	20,8%

T a b e l l e 20
(statistische Auswertung, Versuchsreihe 6)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	6.580	1.316	13,16	0,1%
Zwischen Verfahren	5	9.645	1.929	19,29	0,1%
Zwischen Lokalisationen	5	376	75	-	-
Zw. Quaddel-Typen	1	9.216	9.216	92,16	0,1%
Zw. Kontr.u.Subst. (F)	1	0	0	-	-
Zw. Substanzen (F)	1	8	8	-	-
Zw. Kontr.u.Subst. (H)	1	420	420	4,20	-
Zw. Substanzen (H)	1	0	0	-	-
Rest-Varianz	20	1.997	100		
Gesamt-Varianz	35	18.598	531		

Versuchsstreuung s = 9,99

Verfahren	$\bar{x}(V)$ mm ²	$\int(V)$ mm ²	Sicherung	Hemmung
F _K	193			
H _K	232			
F _{Butazolidin}	194	+ 1 ± 14,6	-	
H _{Butazolidin}	222	- 10 ± 14,6	-	25,6%
F _{Na-Salizylat}	192	- 1 ± 14,6	-	
H _{Na-Salizylat}	222	- 10 ± 14,6	-	25,6%

T a b e l l e 21

(statistische Auswertung, Versuchsreihe 7a u. 7b)

Diskussion

Die Konzentration von 0,2 mg Butazolidin als Zusatz zur verwendeten Farbstoff-Hyaluronidase-Lösung bewirkte eine sehr deutliche Mittelwertsabnahme der FH-Quaddel um 27 mm^2 , ebenso die Konzentration von 0,02 mg um 23 mm^2 (Versuchsreihe 1). Auch die Zusätze von 0,008 mg und 0,014 mg erzielten eine ausgesprochene Verkleinerung von je 26 mm^2 (Versuchsreihe 3), während 0,002 mg mit einer kaum nennenswerten Wertabnahme von 7 mm^2 und 0,0002 mg mit einer Zunahme um 2 mm^2 keinen Effekt zeigten (Versuchsreihe 2).

Die genannten Ergebnisse wurden an intakten Ratten gefunden. Bei adrenalektomierten Tieren sah man eine andere Wirkung von 0,2 mg Butazolidin-Zusatz. Die FH-Quaddel vergrößerte sich im Bereich der Fehlerbreite nur um 1 mm^2 (Versuchsreihe 7a).

Da nun als Maß für die Hyaluronidasehemmung die durchschnittliche Flächendifferenz zwischen einer ungehemmten und einer gehemmten Quaddel einer Versuchsreihe benützt werden kann, läßt sich aus den eben aufgeführten Resultaten für die Konzentrationen 0,2 mg, 0,02 mg, 0,008 mg und 0,014 mg Butazolidin bei Anwesenheit der Nebennieren eine signifikante Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität feststellen. Die Zusätze 0,002 mg und 0,0002 mg bei anwesenden Nebennieren und 0,2 mg nach Entfernung derselben beeinflussten die Hyaluronidasewirkung praktisch überhaupt nicht. Es muß allerdings bemerkt werden, daß in Versuchsreihe 1 und 2 die Ergebnisse des 3. Quaddelpaares nur bedingt auswertbar sind, da im zeitlichen Ablauf der Versuche die Substanz ausgehend von einer sicher wirkenden Maximaldosis in fallender Konzentration zugesetzt wurde. Es ist deshalb eine mögliche Auswirkung der zuerst applizierten höheren Dosis auf den Effekt der folgenden niedrigeren, vielleicht über Hautdiffusion, zu berücksichtigen. In Versuchsreihe 3 jedoch steht die kleinere Dosis vor der größeren, sodaß hier beide Quaddelpaare gleich zu werten sind. Die Grenzdosis für eine noch deutlich sichtbare Hyaluronidasehemmung durch Butazolidin ist demnach zwischen

den noch sicher hemmenden 0,008 mg und den nicht mehr hemmenden 0,002 mg zu suchen.

In den Versuchsreihen mit Natriumsalizylat-Zusatz bei intakten Tieren war als Ergebnis eine signifikante Hemmung der FH-Quaddeln und somit der Hyaluronidase-Aktivität durch 0,5 mg und 0,05 mg (Versuchsreihe 4) zu verzeichnen, was in der negativen Mittelwertsdifferenz von 27 mm^2 , bzw. 25 mm^2 zum Ausdruck kommt. Ferner zeigte sich eine angedeutete Hemmung durch 0,005 mg und 0,0005 mg, die eine Wertabnahme der FH-Quaddel um 11 mm^2 , bzw. 13 mm^2 zur Folge hatten (Versuchsreihe 5). Hinsichtlich der Auswirkung von 0,05 und 0,005 Natriumsalizylat-Zusatz konnte praktisch keine Hyaluronidasehemmung mehr festgestellt werden, da die erste Dosis die FH-Quaddel nur um 7 mm^2 gegenüber der FH-Leerquaddel verkleinerte, und die zweite Dosis eine im Bereich der Fehlerbreite liegende Vergrößerung um 5 mm^2 erbrachte (Versuchsreihe 6). Ebenso fehlt der hyaluronidasehemmende Effekt der 0,5 mg-Dosis bei adrenaletomierten Ratten, was aus der Mittelwertsdifferenz von -2 mm^2 ersichtlich ist (Versuchsreihe 7b). Auch in den Versuchsreihen 4, 5 und 6 sind die Ergebnisse des 3. Quaddelpaares aus den oben erwähnten Gründen nur bedingt verwertbar. Die Grenzdosis für die hyaluronidasehemmende Wirkung von Natriumsalizylat ist mit 0,5 mg festzulegen, bzw. zwischen 0,5 und 0,05 mg anzunehmen.

Eine Direktreaktion der Stoffe mit der Hyaluronidase ist wohl mit Sicherheit auszuschließen, da eine solche zwar in vitro unter Anwendung sehr hoher Dosen festgestellt worden sein soll, im vorliegenden Falle aber nur mit geringen Konzentrationen und in vivo gearbeitet wurde.

Auf Grund des weiter oben erwähnten, bisher vermuteten Hemmungsmechanismus über eine Katecholaminausschüttung des Nebennierenmarks muß erwogen werden, ob nicht auch in der vorliegenden Versuchsanordnung ein ähnlicher, wenn nicht der gleiche Mechanismus zugrundeliegt. Das hieße, daß die in die Quaddel injizierte Substanz resorptiv auf das Nebennierenmark wirken und so sekundär einen hyaluronidasehemmen-

den Effekt erzielen würde. Dieser Weg scheint auf den ersten Blick um so wahrscheinlicher, als bei fehlenden Nebennieren die Hemmung der Hyaluronidase durch die verwendeten Höchstdosen sowohl von Butazolidin, als auch von Natriumsalizylat ausbleibt (Versuchsreihe 7a und 7b). Dabei scheint eine gegenseitige Beeinflussung der Substanzen ausgeschlossen, da sich das Ergebnis auch nach Umkehr der Applikationsreihenfolge praktisch nicht verändert. Wesentlich wäre, daß die Stoffe auch noch in den äußerst geringen Grenzdosen, die noch eine deutliche Hemmung hervorrufen, eine Resorptivwirkung hätten. Das erweist sich aber als unmöglich, wenn man Ergebnisse anderer Untersuchungen, bei denen die Hemmung über Resorption der Substanzen erfolgte, zum Vergleich heranzieht.

N a t h ⁶⁵ stellte für Butazolidin bei intraperitonealer Applikation die Grenzdosis 10 mg pro 200 g Tier nach 60 Minuten Einwirkung fest. In der vorliegenden Arbeit ist die wirksame Grenzdosis noch unter 0,008 mg pro 200 g Tier zu suchen, also bei weniger als dem 1250. Teil von 10mg. Außerdem wurde hier der Zeitfaktor nicht untersucht, d.h. die Quaddelablesung wurde konstant nach 10 Minuten vorgenommen.

Ganz analog liegen für Natriumsalizylat vergleichbare Werte einer Arbeit von B o t h n e r ⁶⁶ vor. Dort ist die subcutan applizierte, noch signifikant hemmende Grenzdosis allerdings mit 10 mg pro 200 g Tier nur 20-200fach höher als die hier gefundene, welche bei einer Dosis zwischen 0,5 und 0,05 mg liegen muß. Wahrscheinlich ist der Grund dieses Größenordnungsunterschiedes in einer unterschiedlichen Resorptionsquote von Butazolidin und Natriumsalizylat zu suchen.

Wenn nun die vergleichsweise angeführten Konzentrationen schon Grenzdosen einer Resorptivwirkung darstellen, dann ist wohl die gleichartige Wirkungsweise der hier eruierten Konzentrationen, die um vieles geringer waren, unmöglich, zumal auch die Einwirkungsdauer viel kürzer war. Somit wäre der angenommene Wirkungsmechanismus über die Nebenniere auf resorptiver Basis und damit ebenso eine mögliche Allgemein-

wirkung der Substanzen aus der lokalen Quaddel heraus mit Sicherheit auszuschließen.

Trotzdem muß der Nebenniere eine entscheidende Rolle im vorliegenden Hemmungsmechanismus zukommen, da ja bei adrenalectomierten Tieren die Hyaluronidasehemmung entfällt. Doch ist eine Erklärung dieses Befundes im Rahmen der vorgelegten Arbeit nicht möglich. Es kann aber die bisher immer wieder festgestellte Tatsache, daß die Anwesenheit der Nebennieren für die Wirksamkeit hyaluronidasehemmender Substanzen notwendig ist, als auch für die hier angewendete Versuchsanordnung zutreffend bestätigt werden. Zur näheren Klärung dieser Zusammenhänge wären Versuche anzuregen, die den hyaluronidasehemmenden Effekt von primär in die Quaddel appliziertem Butazolidin oder Natriumsalizylat unter Einfluß von Ganglienblockern oder Adrenolytika untersuchen.

Nach dem bisher Diskutierten muß man wohl den Angriffspunkt der Hyaluronidasehemmung durch die untersuchten Substanzen in der Peripherie annehmen, und wahrscheinlich lokal in der Quaddel suchen, wobei der eigentliche Mechanismus momentan noch nicht erklärt werden kann. Immerhin würde diese Theorie mit den oben angeführten Ergebnissen von Nath⁶⁵ und B o t h n e r⁶⁶ nicht in Widerspruch stehen, wenn man die durchaus berechtigte Möglichkeit diskutiert, daß die oben aufgeführten Substanzkonzentrationen nach ihrer Resorption schließlich in der Peripherie in Konzentrationen ungefähr gleicher Größenordnung zur Verteilung gekommen sind, wie sie in der vorliegenden Untersuchung verwendet wurden, und somit sogar ein einheitlicher Wirkungsmechanismus der Hyaluronidasehemmung denkbar wäre.

Zusammenfassung

Tierversuche an weißen Ratten dienten der Untersuchung des lokalen Einflusses der antirheumatischen Substanzen Butazolidin und Natriumsalizylat auf das Hyaluronidasespreading in Abhängigkeit von der Dosierung.

Es zeigte sich, daß beide Prüfsubstanzen, wenn sie lokal im Spreadingtest angewendet werden, ab gewissen Grenzdosen bei intakten Tieren eine Hemmung des Spreadingfaktors bewirken. An adrenalectomierten Tieren trat dieser Effekt nicht ein. Dadurch konnte die bedeutungsvolle Rolle der Nebennieren im Mechanismus der Hyaluronidasehemmung auch für diese Versuchsanordnung als zutreffend bestätigt werden.

Eine Direktwirkung der Substanzen auf die Hyaluronidase ist nicht wahrscheinlich.

Ferner ist eine hyaluronidasehemmende Sekundärwirkung der Stoffe nach Resorption vom Applikationsort her, sei es über die Nebennieren-Katecholaminausschüttung, sei es allgemeiner Art, auszuschließen. Dazu berechtigten Vergleiche mit Grenzdosen anderer Arbeiten.

Somit mußte der Angriffspunkt dieser hyaluronidasehemmenden Antirheumatika in der Peripherie liegend angenommen werden, obwohl für den Ablauf des Hemmungsmechanismus die Anwesenheit der intakten Nebennieren notwendig ist.

Die näheren Zusammenhänge dieser Ergebnisse konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

Literaturverzeichnis

- 1) Mathies, H.: Med. Klin. 52, 1676 (1957)
- 2) Terbrüggen, A.: Dtsch. med. J. 5, 312 (1954)
- 3) Terbrüggen, A.: Aerztl. Prax. 6, 40 (1954)
- 4) Abrahams, G., J. Flynn : Clin. Sci. 8, 171 (1949)
- 5) Evers, A.: zit. E. Schliephake, R. Smets, Münch. med. Wschr. 97, 56 (1955)
- 6) Glick, D., B. Sylvén : Science 113, 388 (1951)
- 7) Guerra, F.: Science 103, 696 (1946)
- 8) Hartmann, Matijevic : Zschr. Rheumaforschg. 11, 23 (1952)
- 9) Jahnke : Aerztl. Wschr. 6, 1153 (1951)
- 10) Klemperer, A.: Amer. J. Med. 10, 405 (1951)
- 11) Meyer, K.: Physiol. Rev. 27, 335 (1947)
- 12) Rimington, C.: Ann. Rheumat. Dis. 8, 34 (1949)
- 13) Seifert, J. u. Mitarb.: Proc. Soc. Exper. Med. Biol. 72, 277 (1949)
- 14) Schoen, R.: Dtsch. Med. Wschr. 77, 558 (1952)
- 15) Stepantschitz, G.: Oesterr. Aerztekongr. d. Van-Swieten-Ges., Salzburg, Sept. 1953
- 16) Stepantschitz, G., E. Kresbach : Zschr. Rheumaforschg. 13, 266 (1954)
- 17) Fishman, W.H. u. Mitarb.: J. Clin. Invest. 30, 685 (1951)
- 18) Südhof, H.: Klin. Wschr. 30, 86 (1952)
- 19) Nilsson, West : Biochem. Zschr. 291, 254 (1937)
- 20) Gibian, H.: Angew. Chemie 63, 105 (1951)
- 21) Bywaters, E.G.L., A.H. Dixon : zit. Giggelberger, H.: Dtsch. med. Wschr. 78, 1439 (1953)
- 22) Kleinsorge, H., W. Pohl : Medizinische 1463 (1952)
- 23) Opsahl, J.C. u. Mitarb.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 52, 1141 (1950)
- 24) Schmidt, H. u. Mitarb.: Dtsch. med. Wschr. 75, 790 (1950)
- 25) Schoen, R.: Aerztl. Fortb. 1 (1954)
- 26) Birke, G.: Acta med. Scand. 144, 455 (1953)
- 27) Wattenberg, W., D. Glick: J. biol. Chemie 179, 1213 (1949)

- 28) Kvasniewski : zit. Fährdrich, W.H.: Medizinische 1450
(1952)
- 29) Dry, Butt : Proc. Staff Meeting Mayo Clinic 21, 26 (1946)
- 30) Guerra, F.: J. Pharmacol. 87, 193 (1946)
- 31) Guerra, F.: Proc. Soc. Exper. Bio. a. Med. 87, 3 (1946)
- 32) Dorfmann, A. u. Mitarb.: Amer. J. Dis. Child. 77, 106
(1949)
- 33) Swyer : Biochem. J. 42, 32 (1948)
- 34) Forrest u. Mitarb.: J. Pharmacy Pharmacol. 4, 231 (1952)
- 35) Domenjoz, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 225, 14
(1955)
- 36) Miller, M.: zit. J. Kowarschik : Internat. Moorkongr.
Okt. 1954, Meran
- 37) Evers, A.: Monatskurse f. ärztl. Fortb. 75, 1954
- 38) Mathies, H., A. Jankowski: Klin. Wschr. 35, 892 (1957)
- 39) Mathies, H., G. v. Werther: Zschr. angew. Klimahk. 5,
503 (1958)
- 40) Mathies, H.: Med. Mschr. 12, 685 (1958)
- 41) Mathies, H.: Zschr. ges. exp. Med. 131, 118 (1959)
- 42) Mathies, H.: Zschr. Rheumaforsch. 18, 205 (1959)
- 43) Mathies, H., G. Gareissen: Med. Klin. 55, 190 (1960)
- 44) Mathies, H., M. Vogel: Zschr. ges. exp. Med. 133, 32
(1960)
- 45) Mathies, H., T. Batisweiler; G. Kreiselmaier u. E. Will:
Arzneimittelforsch. 10, 484 (1960)
- 46) Mathies, H., D. Lutz: Arzneimittelforsch. 10, 689 (1960)
- 47) Mathies, H., J. Biechele u. M. Hartmann: Aerzt. Forsch.
XIV, I/160 (1960)
- 48) Mathies, H., A. Aschtiany: Med. Welt 19, 1070 (1960)
- 49) Mathies, H., H.M. Krott: Aerzt. Forsch. XVI, I/521 (1960)
- 50) Mathies, H., E. Fuchs u. D. Hiekmann: Fund. baln.-
bioclim. 1, 433 (1960)
- 51) Mathies, H., E. Will: Arzneimittelforsch. 12, 694 (1962)
- 52) Mathies, H.: Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 64, Kongr. 1958
- 53) Mathies, H.: VI. Internat. Kongr. f. Univers. Moorfor-
schung Juni 1958, Spa.
- 54) Mathies, H.: Arzneimittelforsch. 8, 233 (1958)
- 55) Mathies, H.: Zschr. Rheumaforsch. 17, 375 (1958)

- 56) Mathies, H.: Zschr. Rheumaforsch. 18, 308 (1959)
- 57) Mathies, H.: Pharmazie 14, 429 (1959)
- 58) Mathies, H.: Med. Mschr. 11, 791 (1957)
- 59) Mathies, H., G. v. Werther: Zschr. angew. Bäder-Klimahk.
5, 582 (1958)
- 60) Mathies, H.: Zschr. Rheumaforsch. 17, 375 (1958)
- 61) Mathies, H.: Aerztl. Forsch. XII, I/87 (1958)
- 62) Mathies, H., A. Glück, J. Poulantzias u. D. Schmidt:
Med. Exp. 1, 64 (1959)
- 63) Mathies, H.: Arch. int. pharmacodyn. CXXIII, 334 (1960)
- 64) Mathies, H.: Arch. exp. Path. Pharmacol. 240, 31 (1960)
- 65) Nath, M.: Dissertation München in Vorbereitung
- 66) Bothner, J.: Diss. München in Vorbereitung

Herrn Professor Dr. W. Seitz danke ich für die Überlassung des Themas.

Herrn Dr. H. Mathies bin ich für die Anregungen und die Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas zu besonderem Dank verpflichtet.

Herrn Dipl.-Math. K. Liebrich danke ich für die Durchführung der statistischen Berechnungen.

Meinen Eltern bin ich für ihre finanzielle Unterstützung besonders dankbar.

Am 21.3.1936 wurde ich in Teplitz-Schönau / Sudetenland geboren. Nach fünfjährigem Volksschulbesuch, unterbrochen durch Kriegseinfluß und Evakuierung nach Bayern, besuchte ich ab 1947 zwei Jahre lang das Hum. Gymnasium in Neuburg a. Donau und darauf sieben Jahre das des Benediktinerklosters Metten/Donau, wo ich 1956 auch absolvierte. Das Medizinstudium begann ich im Wi.-Semester 56/57 an der Universität München. Hier schloß ich das vorklinische Studium nach 6 Semestern mit der ärztlichen Vorprüfung im Oktober 1959 ab. Die folgenden 6 klinischen Semester studierte ich ebenfalls in München. Am 13. Februar 1963 beendete ich das klinische Studium mit der ärztlichen Prüfung. In den letzten klinischen Semestern hatte ich mit der Bearbeitung meines Promotionsthemas begonnen. Jetzt befinde ich mich im ersten Jahr meiner Medizinalassistentenzeit an einer Münchner Klinik.

